UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

"Obtención de anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina y su empleo en el inmunodiagnóstico"

Tesis en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología.
Mención Biotecnología Industrial

Autora: Lic. Maibis Leibys García Reyes

Tutor: Dr. C. Esteban J. Gutiérrez Calzado

Santiago de Cuba 2016

DEDICATORIA

A mi madre inspiradora de todos los éxitos alcanzados en mi vida

AGRADECIMIENTOS

Obtención de Anticuerpos Policlonales conjugados con Ficoeritrina y su empleo en el Inmunodiagnóstico.

Agradecimientos

Agradezco a todas aquellas personas que participaron y colaboraron conmigo para la feliz culminación de este trabajo, contribuyendo con su apoyo a mi desarrollo personal, espiritual y profesional, especialmente a:

A mi familia y a mi esposo por su gran consideración, amor, respaldo espiritual y material en todo momento.

A mi tutor Esteban por su gran apoyo y experiencia metodológica crucial para la redacción de este documento.

Al claustro de profesores de la maestría por los conocimientos y la ayuda brindada, especialmente a los de mención Industrial.

A mis compañeros de la maestría especialmente a Grisel, Imilci, Ariel, Sucelt Johanet, Yamirka, Yamila y Abelardo.

A mis compañeros del LPC y OICO, especialmente a: Madelyn, Maida, Yunaisi, Roger, Iliuvis, Marisel, Susel, Herminio, Jehisy, Yailin, Yisel, Marle, Adis, Sula, Yoreivis, Ania por el apoyo y la confianza depositados en mi para el logro de este trabajo.

A mis compañeros de LABEX, con quienes me sentí en casa, especialmente a: Sandra, Rafael, Yusdanis, Niuvis, Geisa, Yanet, Osmany por sus aportes imprescindibles en la ejecución de los trabajos experimentales y por el apoyo técnico.

A todos.

Gracias.

RESUMEN

Obtención de Anticuerpos Policlonales conjugados con Ficoeritrina y su empleo en el Inmunodiagnóstico.

Resumen

El desarrollo de anticuerpos policlonales conjugados, como reactivos secundarios que reconocen la IgG de ratón y la IgG humana en diversos sistemas de detección para el diagnóstico de enfermedades que comprometen el sistema inmune, constituye en la actualidad una de las prioridades del Sistema de Salud cubano. Partiendo de estas bases, en el presente trabajo se conjugaron con ficoeritrina los anticuerpos policlonales anti IgG humana en carnero, y anti IgG humana en pollo, además de IgG de ratón. Los anticuerpos y el pigmento empleados en la investigación fueron obtenidos en LABEX después de procesos de purificación, por inmunoafinidad, para el primero, y por intercambio iónico para el segundo; la pureza de ambos, fue determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), y espectrofotometría UV-Visible. La conjugación se realizó por el método de Hardy, y para la evaluación de la actividad biológica, se utilizaron las técnicas de Citometría de Flujo (CF), y anticuerpos antinucleares (ANA) por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los resultados ponen de manifiesto que el grado de pureza de ambas biomoléculas fue óptimo para su uso en métodos de conjugación. El conjugado IgG de ratón-PE mostró su potencialidad como control negativo por CF, al no presentar marcaje específico, y aquellos contra IgG humana aplicados en la técnica ANA por IFI, demostraron un buen desempeño, al obtenerse patrones de reconocimiento de anticuerpos antinucleares en diluciones de hasta 1:80, comparables a los de referencia. Todos estos hallazgos permiten concluir que este trabajo abre paso a la fase de desarrollo de estos productos para su generalización en el Sistema de Salud.

ABSTRACT

Obtención de Anticuerpos Policlonales conjugados con Ficoeritrina y su empleo en el Inmunodiagnóstico.

Abstract

The development of conjugated polyclonal antibodies, as secondary reagents recognizing mouse IgG, and human IgG in various detection systems for the diagnosis of diseases involving the immune system is now, one of the priorities of the Cuban Health System. On this basis, in the present work, polyclonal anti-human IgG in sheep was conjugated with phycoerythrin, and chicken anti-human IgG, and mouse IgG in addition. Antibodies and pigment used in the investigation were obtained in LABEX after chromatographic purification process; and purity, determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and UV-visible spectrophotometry. Conjugation was performed by the method of Hardy, and for evaluation of biological activity, Flow Cytometry, and antinuclear antibodies (ANA) techniques by indirect immunofluorescence (IIF) were used. The results show that the purity of both biomolecules was optimal for use in conjugation methods. The mouse IgG conjugated - PE showed potential use as a negative control for FC to not show specific staining, and those, against human IgG applied to the IIF-ANA technique, showed a good performance, by obtaining recognitions patterns of antinuclear antibodies in dilutions up to 1: 80, comparable to the reference. All these findings allow us, to conclude, that, this work open the way for the development phase of these products for their generalization in the health system.

ÍNDICE

Obtención de Anticuerpos Policlonales conjugados con Ficoeritrina y su empleo en el Inmunodiagnóstico.

Índice

Leyenda de Abreviaturas 1

Introducción 3

1. Revisión Bibliográfica 6

1.1. Interacción Antígeno/Anticuerpo y su importancia para el inmunodiagnóstico. ... 6

1.2 Obtención de Anticuerpos policlonales. 7

1.2.1. Purificación de Anticuerpos policlonales. 8

1.3. Fluorocromos 10

1.3.1. Ficobiliproteínas. 11

1.3.1.1. Métodos de obtención de ficobiliproteínas 12

1.4. Técnicas inmunoquímicas como base del inmunodiagnóstico. 13

1.4.1. Los conjugados anticuerpos-ficobiliproteínas como parte de las técnicas inmunoquímicas para el inmunodiagnóstico. 14

1.4.2. Inmunofluorescencia 15

1.4.3. Citometría de flujo 16

1.5. Importancia de los conjugados anticuerpo-ficoeritrina para el diagnóstico de Enfermedades Autoinmunes. 17

2. Materiales y Métodos 20

2.1. Obtención de anticuerpos policlonales purificados. 20

2.1.1. Ensayo de pureza de las muestras. 20

2.1.2. Determinación de la concentración por espectrofotometría. 21

2.2. Obtención de β-ficoeritrina 21

2.2.1. Métodos Espectrofotométricos 22

2.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida. 23

2.2.3. Almacenamiento de la β-PE 23

empleo en el Inmunodiagnóstico.

Índice

Índice

2.3. Obtención de los Anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina (PE). 24

2.3.1. Preparación de la ficoeritrina (PE). 24

2.3.1.1. Derivatización de la ficoeritrina (PE) 24

2.3.2. Reducción de los anticuerpos 24

2.3.3. Conjugación covalente 25

2.3.4. Purificación de los Conjugados 25

2.3.5. Almacenamiento de los conjugados 25

2.4. Determinación de la actividad biológica de los productos conjugados 26

2.4.1. Determinación de la actividad biológica por Citometría de Flujo. 26

2.4.2. Determinación de la actividad biológica por Microscopía de Fluorescencia. 27

3. Resultados y Discusión 28

3.1. Obtención de anticuerpos policlonales purificados 28

3.1.1. Determinación de la pureza de los anticuerpos purificados 28

3.1.2. Determinación de la concentración de los anticuerpos por espectrofotometría. 29

3.2. Obtención de ficoeritrina. Determinación de su concentración y pureza. 30

3.3. Obtención de los Anticuerpos policlonales conjugados con B-ficoeritrina (B-PE). 33

3.4. Actividad biológica de los conjugados. 35

3.4.1. Determinación de la actividad biológica por Citometría de Flujo. 36

3.4.2. Determinación de la actividad biológica por Microscopía de Fluorescencia. 37

3.5. Valoración económica aplicada a la obtención de los anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina. 39

4. Conclusiones 41

5. Recomendaciones 42

6. Referencias Bibliográficas 43

7. Anexos

LEYENDA DE ABREVIATURAS

Leyenda de Abreviaturas

LABEX: Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales.

CIM: Centro de Inmunología Molecular

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

Ig: Inmunoglobulina

B-PE: Beta ficoeritrina

CMF: Citometría de Flujo

HC: Cadena pesada (heavy chain)

LC: Cadena ligera (light chain)

Fab: Fragmento de unión al antígeno (fragment antigen union)

Fc: Fragmento cristalizante

BSA: Albúmina sérica bovina

I.F.I: Inmunofluorescencia Indirecta

I.F.D: Inmunofluorescencia Directa

ANA: Anticuerpos antinucleares

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

SNC: Sistema de Salud Nacional

SSC: Dispersión lateral de la luz (side scatter)

FSC: Dispersión frontal de la luz (forward scater)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

PBS: Tampón fosfato salino (Siglas del inglés: "Phophate buffered saline")

DMSO: Dimetilsulfóxido

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

SMCC: Succinimidil 4- (N-maleidometil) ciclohexano-1-carboxilato

DTT: Ditiotreitol

NEM: N-etilmaleimida

UV: Ultravioleta

empleo en el Inmunodiagnóstico

Leyenda de Abreviaturas

DO: Densidad óptica

rpm: Revoluciones por minuto

SIGMA: Compañía productora y comercializadora de reactivos químicos y otros insumos científicos

INTRODUCCIÓN

Introducción

Los anticuerpos son inmunoglobulinas (Ig) que pueden reaccionar específicamente con el antígeno que estimuló su producción y cada molécula de anticuerpo posee en su estado monomérico dos sitios de combinación con dicho antígeno.[1]

La producción de anticuerpos es una práctica frecuente en los laboratorios de investigaciones biomédicas y en los centros de obtención de biopreparados para el diagnóstico y la terapéutica[2].

Los conjugados como reactivos biológicos, constituyen en la actualidad una de las herramientas indispensables para la confirmación del diagnóstico y evolución de las enfermedades inmunológicas.[3, 4]Estos son productos en los que está presente un anticuerpo con una determinada especificidad unido a una molécula que puede ser coloreada (fluorocromos), bien puede ser una enzima, o un isótopo. Existen dos tipos de conjugados, los primarios y los secundarios. Particularmente, los conjugados secundarios son ideales para el montaje de diferentes técnicas inmunológicas o imunoensayos como: ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA), Inmunoblot e Inmunofluorescencia. Se destacan por sus numerosos usos en la práctica clínica, entre ellos, el diagnóstico de enfermedades que comprometen el sistema inmune.[5]

Se conocen múltiples enfermedades asociadas al sistema inmune, entre las que se incluyen inmunodeficiencias, ya sean primarias, o secundarias, linfomas o mielomas, enfermedades autoinmunes[5].

Especial interés suscitan las enfermedades autoinmunes, las que se caracterizan por una alteración de los mecanismos de tolerancia inmunológica, en particular por

la producción de anticuerpos que reconocen estructuras o antígenos propios, como por ejemplo, los anticuerpos antinucleares (ANA).[6,7]Estos autoanticuerpos se hallan altamente asociados a diferentes enfermedades del tejido conectivo y en algunas ocasiones a enfermedades hepáticas autoinmunes.[8,9] Si bien existen signos y síntomas característicos de cada una de ellas, hay un grupo de pacientes que comienzan con una sintomatología general inespecífica; por este motivo, la detección de ANA y la correcta identificación de la imagen puede ser muy útil para definir u orientar hacia una enfermedad en particular. Entre las técnicas que se emplean para el diagnóstico de estas enfermedades contamos con Inmunofluorescencia directa e indirecta y Citometría de Flujo, [10, 11] las cuales emplean anticuerpos conjugados con fluorocromos, entre ellos, la ficoeritrina.

La producción nacional de reactivos diagnosticadores (IgG ratón, anti IgG humana en carnero, y anti IgG humano en pollo conjugados con ficoeritrina) es de gran interés para nuestro país. El disponer de estos reactivos en nuestra red de producción brinda la posibilidad de abastecer al Sistema Nacional de Salud permitiendo sustituir importaciones y mediante estos, la realización de contratos con otros países. Por todo lo antes expuesto, nos hemos planteado el siguiente **problema de investigación:**

En nuestro país existe una gran demanda de herramientas diagnósticas a base de anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina (PE), los cuales poseen una importancia médica y repercusión económica social, por el hecho de su utilidad en técnicas inmunohistoquímicas y citometría de flujo. Los precios elevados que poseen estos conjugados en el mercado internacional, hacen muy difícil su adquisición, por lo que es inminente realizar estudios que permitan apropiarnos de procedimientos para la obtención de estas moléculas, con adecuados niveles de pureza y con actividad biológica requerida.

Obtención de Anticuerpos Policlonales conjugados con Ficoeritrina y su empleo en el Inmunodiagnóstico.

Introducción

En aras de resolver el problema científico se formuló la siguiente hipótesis.

Hipótesis:

Es posible obtener en LABEX anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina (PE) con los requisitos de calidad apropiados para su uso en el inmunodiagnóstico.

Para dar cumplimiento a la hipótesis planteada se proponen los siguientes objetivos.

General

- Obtener anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina (PE)

Específicos

1. Obtener IgG ratón conjugado con ficoeritrina (PE)
2. Obtener anti IgG humana en carnero conjugado con ficoeritrina (PE)
3. Obtener anti IgG humana en pollo conjugado con ficoeritrina (PE)
4. Evaluar la actividad biológica de los conjugados en estudio mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

1. Revisión Bibliográfica

1.1. Interacción Antígeno/Anticuerpo y su importancia para el inmunodiagnóstico.

La definición clásica de antígeno es cualquier sustancia foránea que incita una respuesta inmune cuando es introducida dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinarse con los anticuerpos específicos formados. Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son de naturaleza proteica o polisacarídica. Otras moléculas de menor peso molecular también pueden funcionar como antígenos; por ejemplo, polipéptidos, lípidos y ácidos nucleicos. La respuesta inmune puede además ser generada contra sustancias pequeñas, llamadas haptenos, si estos están acoplados a una proteína acarreadora, como la albúmina de suero bovino (BSA) u otras matrices sintéticas. [12]

Un anticuerpo se define como una inmunoglobulina (Ig) capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un animal susceptible. Son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo. [13]

Los anticuerpos existen como una o más unidades en forma de Y, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada unidad (Y) contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (HC, heavy chain) y dos copias idénticas de una cadena ligera (LC, light chain); llamadas así, por sus pesos moleculares relativos, que son de aproximadamente 50 kDa, y de 25 kDa, respectivamente. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuros S-S intercatenarios y pueden separarse por reducción y acidificación (Anexo 1)[14].

Las partes de las regiones hipervariables del anticuerpo que contactan con el antígeno se denominan parátopos, y la región de un antígeno que puede específicamente unirse a un anticuerpo es llamado epítope.[14]

Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en el número de unidades Y, y en el tipo de cadena pesada (Anexo 2)[14]. El anticuerpo más abundante en la circulación es la IgG, por lo que es el más comúnmente usado en ensayos inmunoquímicos.

Los anticuerpos son producidos naturalmente por los linfocitos B en los mamíferos. Cada estirpe de linfocito B presente en el cuerpo secreta un anticuerpo diferente, por lo que el suero sanguíneo constituye una fuente de anticuerpos heterogéneos (policlonales); siendo los anticuerpos de estructura homogénea (monoclonales) los que se caracterizan por una especificidad constante, ambos tipos de anticuerpos son útiles en el diagnóstico.[13]

El uso extensivo de anticuerpos policlonales en la investigación, ha abierto las puertas hacia la necesidad de crear estrategias y métodos adecuados para su producción y purificación en cantidades y calidad suficientes para cada aplicación específica.

1.2 Obtención de Anticuerpos policlonales.

Cuando se diseña un procedimiento experimental es importante diferenciar entre anticuerpos monoclonales y policlonales, pues estas diferencias son el fundamento de las ventajas y limitaciones en su uso.

Una característica de grandes moléculas antigénicas es que ellas inducen la activación de muchas células B productoras de anticuerpos en el animal inmunizado. Esta mezcla de anticuerpos policlonales resultante puede entonces reconocer una variedad de epítopes sobre el antígeno, la cual puede

ser una característica de uso especial en algunos procedimientos experimentales[4].

Debido a que esta mezcla de anticuerpos policlonales reacciona con múltiples epítopes sobre la superficie del antígeno, ellos pueden ser más tolerantes a cambios menores en el antígeno, por ejemplo, polimorfismo, heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización, que los anticuerpos monoclonales (homogéneos). [13]

Habitualmente se obtienen de lo que se denomina un antisuero. Obtenido de la inyección reiterada de un antígeno en un animal, con el fin de generar una respuesta inmune. De este animal se toma una muestra de sangre y de esta muestra es obtenido el suero que finalmente es purificado para obtener la variedad de anticuerpos policlonales de interés[4].

1.2.1. Purificación de Anticuerpos policlonales.

Una parte importante de las investigaciones bioquímicas incluye la purificación de las biomoléculas en cuestión, debido a que estas sustancias deben hallarse relativamente libres de contaminantes. Consiste en una serie de procesos que permiten aislar un solo tipo de proteína de una mezcla compleja, siendo vital para la caracterización de la función, estructura e interacciones de la proteína de interés.[15]

Las proteínas se purifican mediante métodos de fraccionamiento como: [16]

- Precipitación por salado, con solventes
- Diálisis
- Concentración previa (Amicón)
- Cromatografía
- Electroforesis

Las separaciones cromatográficas se basan en las diferencias de carga, tamaño o afinidad de las diferentes proteínas.

Recientemente la I.U.P.A.C define la cromatografía de forma más amplia como: Método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa y/o distribuida como una película. [17]

Entre los mecanismos de separación cromatográfica podemos citar: adsorción, filtración en gel o tamices moleculares, intercambio iónico y otros.[18]

La cromatografía es la técnica más empleada para la purificación de anticuerpos, el empleo de la cromatografía para la purificación es muy usado por las industrias y centros de investigación biotecnológicos haciendo que su valor en el mercado internacional sea más elevado con el transcurso de los años.[19]

La cromatografía de exclusión molecular, filtración en gel o tamizaje molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular. Como su nombre lo indica es una técnica que utiliza como medio de separación un lecho de partículas pequeñas en estado de gel, que por lo general se encuentran empaquetadas en un tubo en forma de columna. [20]

La separación por cromatografía de intercambio iónico depende de la adsorción reversible de las moléculas de soluto cargadas a grupos inmovilizados de intercambio iónico de carga opuesta.

La separación se obtiene debido a los diferentes grados de interacción con el intercambiador de iones por las diferencias de cargas en sus superficies. Estas interacciones pueden ser controladas mediante la variación de condiciones tales como la fuerza iónica y el pH. [21]

1.3. Fluorocromos

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente, estos se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión. Estos espectros varían en los diferentes fluorocromos.[22]

Las propiedades reconocidas de un buen fluorocromo reportadas en literatura son: alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación, alto rendimiento cuántico, elevada fotoestabilidad, corto estado de excitación, su espectro de absorción debe ser lo más cercano posible al espectro de emisión del láser utilizado, el espectro de emisión debe ser diferente al de absorción para asegurar que ambas señales se separan y se deben utilizar colorantes que formen uniones con las proteínas (sin afectar los grupos de combinación específica del anticuerpo). [23]

Se describen dos clases de fluorocromos, según la interacción que establece con el anticuerpo:

- Fluorocromos de unión covalente: son moléculas orgánicas pequeñas que forman una unión covalente con grupos amino libres en los anticuerpos. Como ejemplo tenemos el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), ficoeritrina (B-PE), rodamina, rojo texas, cianinas.[24]

- Fluorocromos de unión no covalente: se unen no covalentemente a estructuras dentro de la célula, son por ejemplo: Hoechst, DAPI, Naranja de acrimina, yoduro de propidio y otros.

1.3.1. Ficobiliproteínas.

Las ficobiliproteínas actúan como pigmentos accesorios para la fotosíntesis en algas marinas de las Rhodophyceae, Cyanophyceae, Cryptophyceae y algunas Pirrophyceae.[25] Se encuentran organizadas en estructuras celulares, llamadas ficobilisomas, las cuales están unidas en conjuntos regulares a la superficie exterior de los tilacoides(Anexo 3).

Las ficobiliproteínas se encuentran en muy alta concentración en muchas algas (*P. cruentum* o cianobacteria *Anabaena variabilis*) y pueden ser encontrados numerosos reportes en literatura de protocolos a partir de estas algas donde pueden crecer relativamente fácil en laboratorio a escala de cultivo.[26]

Las propiedades espectroscópicas de las biliproteínas individuales dependen principalmente de la naturaleza química de las bilinas. Las ficobiliproteínas se dividen en tres clases según sus propiedades de absorción: ficoeritrinas (λmax ~ 540–570 nm), las cuales contienen los cromóforos ficoeritrobilina y ficourobilina; ficocianinas (λmax ~ 610–620 nm), que contienen ya sea una mezcla de los cromóforos ficocianobilina y ficoeritrobilina o sólo ficocianobilina, según la especie de origen; y aloficocianinas (λmax ~ 650–655 nm), con ficocianobilina como grupo prostético [27]

Los cromóforos dan un color característico a cada ficobiliproteína: rojo a la ficoeritrina, azul brillante a la ficocianina y verde azulado a la aloficocianina. Se ha encontrado que las principales clases de ficoeritrinas difieren en sus características de absorción: las B-ficoeritrinas muestran λmax ~ 565 y 546 nm,

con un hombro a ~499 nm; las R-ficoeritrinas λmax ~ 568 y 499 nm, con un hombro a ~545 nm; y las C-ficoeritrinas λmax ~ 565 nm[25].

Dentro de la familia de las ficobiliproteínas, la β-ficoeritrina es la mejor elección para el conjunto de aplicaciones citadas como consecuencia de sus características espectroscópicas más ventajosas, tanto absorciométricas como fluorimétricas, debido a su alto coeficiente de extinción molar (que le confiere un intenso color rosa brillante) al disponer de 32 cromóforos en su molécula. Además, los acoplamientos intermoleculares de los cromóforos le confieren un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia (permite su detección con mayor sensibilidad que otros fluorocromos convencionales), en una región espectral distinta a la región en que se presenta la auto-fluorescencia en las preparaciones biológicas (motivada por la presencia de triptófano y otros pigmentos fluorescentes). En adición, posee un mayor desplazamiento de Stokes que la mayoría de los fluorocromos orgánicos comúnmente utilizados como marcadores fluorescentes.[28]

1.3.1.1. Métodos de obtención de ficobiliproteínas

A la fecha se han propuesto métodos muy diferentes para la purificación de la ficobilipoteínas de microalgas. Generalmente se obtienen ficobilipoteínas puras de extractos crudos de algas mediante una combinación de diversos métodos cromatográficos y precipitación con sulfato de amonio. La mayoría de los métodos propuestos constan de dos etapas: primero se extraen las ficobilipoteínas de la biomasa y después se purifica el extracto obtenido[29,30].(Anexo 4)

La ruptura de las células puede ser usando prensa francesa, homogenizador, lizosima, congelación descongelación y por choque osmótico. El debris celular es removido por centrifugación y el sulfato amonio para precipitar las ficobiliproteínas. Una o más etapas de intercambio iónico son realizadas, que puede ser por resina

o por hidroxiapatita, y como pasos finales de la purificación pueden emplearse la filtración en gel o cristalización.[25]

Particularmente, la ficoeritrina se purifica clásicamente por una combinación de varias técnicas como la precipitación de sulfato de amonio, la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía en hidroxiapatita [31]. Los procedimientos de la purificación son a menudo largos y complejos. Por esta razón el uso de esta biliproteína ha estado algo limitado por la preparación tediosa de cantidades adecuadas de la proteína purificada.

1.4. Técnicas inmunoquímicas como base del inmunodiagnóstico.

Gran parte de los progresos alcanzados por la biología moderna se deben al perfeccionamiento de los métodos analíticos de medida. Dentro de los procedimientos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que se basan en la especificidad de la unión Ag-Ac, asociación dependiente de los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de Van Der Waals. [32]La propiedad que tiene la Ig de unirse a un Ag, la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda ser visualizable por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hace que estos métodos se empleen ampliamente. [33]

Dado que los antígenos y anticuerpos se caracterizan por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro. Existen diversos métodos analíticos basados en procedimientos distintos para visualizar la unión Ag-Ac, como por ejemplo: técnicas de inmunoprecipitación, técnicas de inmunoaglutinación, técnicas inmunofluorimétricas, técnicas inmunorradiológicas y técnicas inmunoenzimáticas[33] (Anexo 5).

1.4.1. Los conjugados anticuerpos-ficobiliproteínas como parte de las técnicas inmunoquímicas para el inmunodiagnóstico.

Los conjugados como reactivos biológicos constituyen en la actualidad una de las herramientas indispensables para confirmación del diagnóstico y evolución de las enfermedades inmunológicas. [34]

La conjugación del fluorocromo al anticuerpo depende de varios factores como son: cantidad de fluorocromo añadido, pH del medio, tiempo de contacto, temperatura, naturaleza de las proteínas y especie de la que procedan las globulinas y el fluorocromo empleado debe reunir una serie de cualidades citadas en el acápite anterior[35].

Entre las ficobiliproteínas, la B-ficoeritrina (B-PE) es la más valiosa de las tres clases de ficoeritrinas (B, R y C) debido a su gran eficiencia de fluorescencia y su intenso y particular color rosa. Por lo tanto, es ampliamente utilizada como una sonda fluorescente y reactivo analítico[30].

Los primeros marcajes con ficobiliproteínas se remontan a 1982, cuando fueron introducidos por primera vez como blanco, inmediatamente después se expandió su uso en ensayos clínicos, diagnóstico, histoquímica y en múltiples investigaciones.[36]El creciente uso de la ficoeritrina es debido a su aplicación en el acoplamiento a proteínas o moléculas de interés, como son: anticuerpo, avidina, drogas, etc. La unión de ficobiliproteínas a moléculas específicas es realizada a través de los reactivos heterobifuncionales que dan lugar a la formación de un enlace covalente; los más usados son SPDP, SMCC y GMBS.[37]

Dentro de las técnicas más usadas en el Inmunodiagnóstico, y que utilizan anticuerpos acoplados a fluorocromos, entre ellos, la ficoeritrina, se encuentra la Inmunofluorescencia y la Citometría de Flujo.

1.4.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente, para demostrar la presencia de una determinada molécula. Como todos los inmunoensayos, aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad a una determinada molécula blanco; pero se diferencia de otras técnicas inmunoquímicas en que la señalización del anticuerpo es una molécula fluorescente.[41]

1.4.2.1. Tipos de Inmunofluorescencia

Existen dos tipos de técnicas de inmunofluorescencia: primaria (o directa) y secundaria (o indirecta) (Anexo 6).

a) Primaria o Directa

La inmunofluorescencia primaria, o directa, también conocida por sus siglas IFD (Inmunofluorescencia Directa), hace uso de un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluoróforo o fluorocromo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente. Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a la IFI (indirecta). Reduce el número de etapas necesarias, por lo tanto es más rápida, y por otro lado es menos sensible a interferencias debidas a reactividad cruzada de los anticuerpos o a reacciones no específicas.[41]

b) Secundaria o IFI

La Inmunofluorescencia secundaria, o indirecta (también conocida por sus siglas IFI) hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se

une a la molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluorocromo reconoce al primario y se une a él. Esta técnica es un poco más compleja que la IFD, requiere más pasos y es posible que sufra interferencias, pero en contrapartida es mucho más flexible que una técnica directa y debido a que es posible que un anticuerpo primario una a más de un anticuerpo secundario, implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica. [42]

Esta técnica es posible, debido a la existencia de varios anticuerpos que reconocen diferentes antígenos (tienen diferentes regiones variables) pero comparten la misma región constante. Todos estos anticuerpos con diferentes especificidades pueden ser reconocidos a su vez por un único anticuerpo secundario que reconozca la región constante. Esto minimiza el esfuerzo técnico y el costo de modificar cada uno de los anticuerpos primarios para acarrear el fluorocromo. [39]

1.4.3. Citometría de flujo

Una herramienta poderosa para definir y enumerar leucocitos, es la Citometría de Flujo (CMF). Esta es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de algunos laboratorios clínicos y de investigación del fenotipaje de estirpes celulares diferentes.[33]

Es una tecnología que permite la medición simultánea de múltiples características de células en suspensión, por medio del instrumento llamado Citómetro. En el sistema se utilizan Acs marcados con fluorocromos para la detección de antígenos sobre las superficies celulares; de forma tal, que cuando el Ac reacciona con el antígeno se forma un complejo inmune y el fluorocromo acoplado al Ac al recibir la luz incidente emite una señal fluorescente que revela la reacción detectada por el Citómetro.

Entre las ventajas de la citometría de flujo respecto a otros métodos para el diagnóstico de células tumorales se distinguen los siguientes: permite disponer de los resultados en breve tiempo, posee sensibilidad (10^{-4} o 10^{-5}) y especificidad diagnóstica en la discriminación de diferentes poblaciones celulares, así como información simultánea sobre varios parámetros celulares.[43]

Los métodos manuales de recuento celular por inmunofluorescencia son muy lentos y laboriosos, en comparación con las amplias posibilidades de análisis y la automatización que ofrece la citometría de flujo. Claro está, el principal obstáculo para una mayor difusión de la citometría de flujo, en los laboratorios medianos y pequeños, radica en el alto costo de los instrumentos, así como en la complejidad técnica para el adecuado mantenimiento de los mismos.

1.5. Importancia de los conjugados anticuerpo-ficoeritrina para el diagnóstico de Enfermedades Autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes son la consecuencia de una respuesta inmune contra componentes del propio huésped. Esto significa que en todos los individuos se hallan presentes células linfocitarias capaces de reconocer autoantígenos, si bien los clones potencialmente más peligrosos se encuentran bajo un estricto control. La falta de respuesta a ciertos autoantígenos puede deberse también a la tolerancia clonal, esto está dado, a que los autoantígenos se hallen en sitios biológicamente no accesibles para el sistema inmunitario o que no sean apropiadamente "presentados" a las células T. La alteración en un momento dado de cualquiera de estos mecanismos de control puede dar origen a un estado de autoinmunidad anormal y la generación de una enfermedad autoinmune.[12]

Las enfermedades autoinmunes pueden ser sistémicas o específicas de órganos. Por ejemplo, la formación de inmunocomplejos circulantes compuestos por

autoantígenos y anticuerpos específicos produce enfermedades como el Lupus eritematoso sistémico (LES). Por otro lado, los autoanticuerpos o las respuestas de linfocitos T contra autoantígenos de distribución restringida en los tejidos producen enfermedades específicas de órganos, como la miastenia grave, la diabetes mellitus tipo I y la esclerosis múltiple.[38, 39]

Existe un grupo de enfermedades autoinmunes cuya inclusión en las dos categorías citadas resulta difícil por el hecho de que presentan características de ambos grupos: afectan exclusiva o preferentemente un órgano, pero existen autoanticuerpos contra estructuras antigénicas diversas, sobre todo nucleares.[38]

La relación entre los autoanticuerpos y las manifestaciones clínicas constituye un campo de gran interés para la investigación. Con la progresiva caracterización molecular de los autoantígenos, ha quedado claro que las enfermedades autoinmunes se asocian a un determinado panel de autoanticuerpos. La mayoría de estos autoanticuerpos van dirigidos contra antígenos nucleares. [39]

Algunos de los anticuerpos antinucleares se han asociado específicamente a una enfermedad y se utilizan como marcadores para su diagnóstico. Los anticuerpos antinucleares (ANA) son fundamentales en el diagnóstico y exclusión de enfermedades autoinmunes, pues en estas los ANA son positivos en un porcentaje alto. Sin embargo, a la vez son inespecíficos ya que se pueden encontrar en enfermedades autoinmunes órgano-específicas, en enfermedades infecciones crónicas, linfoproliferativas y también en población sana (personas de la tercera edad, mujeres y familiares de primer grado de pacientes con enfermedades reumatológicas ANA positivas). Es por esto que su evaluación debe ser realizada dentro del contexto clínico del paciente y con una sospecha diagnóstica que lo justifique. De aquí, que la conjugación con la ficoeritrina, de inmunoglobulinas contra estos autoanticuerpos, resulta de importancia como

evidencia adicional para el diagnóstico y caracterización de este tipo de enfermedades. Tiene relevancia también, el título en que son positivos: a mayor dilución más significativo es su hallazgo. [40]

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y Métodos

2.1. Obtención de anticuerpos policlonales purificados.

Los anticuerpos utilizados para la investigación (IgG ratón, anti IgG humana en carnero y anti IgG humano en pollo) fueron obtenidos por el grupo de Desarrollo de Tecnologías del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Santiago de Cuba. El grado de pureza de los mismos fue garantizado por el proveedor para los fines de conjugación ya que estos se lograron después de un proceso de purificación por inmunoafinidad.

2.1.1. Ensayo de pureza de las muestras.

Para la determinación de la pureza de los purificados se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

2.1.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para comprobar la pureza e integridad de los anticuerpos purificados, se aplicó la técnica de electroforesis no reducida y reducida en geles de poliacrilamida. La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en presencia de Duodecil Sulfato de Sodio (desnaturalizante) y en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol) es un método rápido, reproducible y de bajo costo ampliamente utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas.[44, 45] Se utilizó un sistema de electroforesis vertical con patrón comercial de peso molecular (Unstained de Biorad®) en un equipo de electroforesis Mini Protean 3®Cell (Bio-rad; Alemania) [45].

2.1.2. Determinación de la concentración por espectrofotometría.

La determinación de la concentración de anticuerpos se realizó mediante espectrofotometría (UV-visible), utilizando el espectrofotómetro marca PG INSTRUMENTS modelo T60U.

La determinación de la concentración de proteína en el purificado se realizó aplicando el método espectrofotométrico, utilizando la ecuación de Lambert-Beer.[47]

C (mg/mL)= A280 x 1/E x FD (1)

A280: Absorbancia a 280 nm
E: coeficiente de extinción de la IgG carnero a 280 nm es 13.6 %
E: coeficiente de extinción de la IgY de gallina a 280 nm es 14.1%
FD: Factor de dilución de la muestra.

Se preparó como Tampón de lectura, un buffer Fosfato Salino 0,01 M pH 7.2, se vertió la dilución 1/10 y 1/15 de la muestra purificada en una cubeta de cuarzo y se midió la densidad óptica a 280 nm, se realizaron tres lecturas con el fin de lograr repetibilidad.

2.2. Obtención de β-ficoeritrina

La ficoeritrina empleada para la conjugación fue obtenida por el grupo de Desarrollo de Tecnologías de LABEX, para la obtención de este pigmento se utilizó la cepa de la microalga roja *Porphyridium cruentum,* esta biomasa fue obtenida en el Centro de Investigaciones de Energía Solar (CIES). El grado de pureza de la misma fue garantizado por el proveedor para los fines de conjugación.

2.2.1. Métodos Espectrofotométricos

El criterio utilizado con mayor frecuencia para determinar la pureza de la solución de biliproteínas es la razón de absorción Amax visible/A280; no obstante, se debería confirmar la pureza con otros métodos experimentales.

A las fracciones coloreadas se les realizó un barrido espectrofotométrico donde se midieron las absorbancias a 280, 495, 545, 565, 620 y 650 nm en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro UV-visible PG Instruments T60U) en cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor, todas las lecturas fueron tomadas a temperatura de laboratorio.

Una vez obtenida la proteína, se corroboró la pureza midiendo la absorbancia a 495 y 545 nm y desarrollando la siguiente relación DO545 nm/DO 495 nm ≥ 2.

Las cantidades de β-PE, R-PC y APC en los diferentes extractos donde están contenidas las ficobiliproteínas fueron calculadas teniendo en cuenta las absorbancias de 565, 620 y 650 nm mediante las ecuaciones siguientes[25]:

$$\text{R-PC} = \frac{DO_{620\,nm} - 0{,}7 \times DO_{650\,nm}}{7{,}38} \quad (mg/mL) \qquad (2)$$

$$\text{APC} = \frac{DO_{650\,nm} - 0{,}19 \times DO_{620\,nm}}{5{,}65} \quad (mg/mL) \qquad (3)$$

$$\text{B-PE} = \frac{DO_{565\,nm} - 2{,}8(\text{R-PC}) - 1{,}34(\text{APC})}{12{,}70} \quad (mg/mL \qquad (4)$$

De estas ecuaciones se obtienen las concentraciones de R-PC, APC Y β -PE.

Donde:

R-PC: ficocianina.

APC: aloficocianina.

β -PE: β-ficoeritrina.

DO_{620}: densidad óptica para una longitud de onda de 620 nm.

DO_{650}: densidad óptica para una longitud de onda de 650 nm.

DO_{565}: densidad óptica para una longitud de onda de 565 nm.

2.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La pureza se determinó además mediante técnica de electroforesis, usando la metodología descrita en el acápite 2.1.2 para la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se utilizó un sistema de electroforesis vertical con patrón comercial de peso molecular (Unstained de Biorad®) en un equipo de electroforesis Mini Protean 3®Cell (Bio-rad; Alemania).

2.2.3. Almacenamiento de la β-PE

Se le añadió sulfato de amonio hasta lograr una solución al 40 % y luego fue envasada en frascos color ámbar y almacenada en un refrigerador (LG) a una temperatura de 4 a 8 ^{o}C para su posterior uso.

2.3. Obtención de los Anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina (PE).

La conjugación se realizó teniendo en cuenta el protocolo descrito por Hardy. [45]

2.3.1. Preparación de la ficoeritrina (PE).

Se dializó la ficoeritrina primeramente contra 2 L de buffer PBS y posteriormente contra 1 L de buffer fosfato 50 mM, 1mM EDTA pH7.

Se utilizaron 3,2 mg de B-PE por mg de anticuerpo, lo que incluye un 10% de la pérdida durante los intercambios de amortiguamiento.

La pureza y la concentración de la PE se determinaron midiendo la absorbancia a 495 y 545 nm. Una razón de 545/495 ≥2 indicó una eliminación adecuada de todas las otras proteínas.

2.3.1.1. Derivatización de la ficoeritrina (PE)

Se preparó una solución madre de 10 mg/mL de SMCC en DMSO seco inmediatamente antes de su uso. Luego se añadió 11 uL de SMCC por mg de PE, en un tubo de reacción cubierto en papel de aluminio y se sometió a rotación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Seguidamente se purificó la PE derivatizada empleando una columna de filtración en gel (PD-10) preequilibrada con buffer fosfato 50 mM 1mM EDTA pH7.

2.3.2. Reducción de los anticuerpos

Se preparó una solución fresca de 1 M DTT (15,4 mg/100 uL) en agua destilada.

Se añadieron 20 uL de DTT por mL de solución de anticuerpo, luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos sin mezcla adicional. Posteriormente se pasó el anticuerpo reducido por una columna de filtración en gel (PD-10) preequilibrada con cambio de buffer, se colectaron 0.25 mL para determinar la concentración por espectrofotometría, seguidamente se llevó a cabo la conjugación.

2.3.3. Conjugación covalente

Se adicionaron 3,2 mg de SMCC-PE por mg de anticuerpo, se envolvió el tubo de reacción en papel de aluminio y se sometió a rotación durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Una vez transcurridos 60 minutos se preparó una solución fresca de 10 mg de NEM en 1,0 mL de DMSO anhidro. Se añadieron 34 mg (3.4 uL) por mg de anticuerpo. Luego se envolvió el tubo de reacción en papel de aluminio y se sometió a rotación a temperatura ambiente durante 20 minutos.

2.3.4. Purificación de los Conjugados

La purificación de los anticuerpos conjugados por el protocolo de conjugación descrito se realizó por filtración en gel en columnas PD-10 (Pharmacia®) utilizando una matriz de Sephadex G-25 y un Buffer Fosfato Salino 0,01 M como tampón a pH 7,2.

2.3.5. Almacenamiento de los conjugados

Los conjugados se almacenaron de 2°C a 8°C después de adicionarles azida sódica para lograr una concentración final de 1.3 mM.

2.4. Determinación de la actividad biológica de los productos conjugados

2.4.1. Determinación de la actividad biológica por Citometría de Flujo.

La determinación de la actividad biológica del conjugado IgG ratón con PE se realizó por la técnica de citometría de flujo, para lo cual se prepararon diluciones del producto conjugado de IgG ratón comercial a cuatro diluciones (1:5, 1:10, 1:20, 1:40) con buffer Facs Flow, cada dilución se homogenizó con el vórtex. Como control positivo se utilizó un anti IgG ratón conjugado con PE (DAKO®).

En 4 tubos Falcon de 5 mL, se añadió 100 µL de sangre total humana, 20 µL de cada dilución del Ac policlonal conjugado a evaluar. Se montó un control negativo (con 100 µL de sangre total del donante) y se comparó con otros cuatro tubos a cuatro diluciones del anti IgG ratón conjugado con PE (DAKO®) 1:5 y 1:10, a los cuales se le añadió 100 µL de sangre total del donante y 10 µL del producto de referencia. Todos los tubos se homogenizaron en el vórtex e incubaron a 4 °C durante 30 min a poca luminosidad. Luego de la incubación a cada tubo se le añadió 2 mL de solución de lisis y se centrifugó por 5 min a 1500 r.p.m. a 4 °C, con cuidado de no perder las células. Se desechó el sobrenadante y se añadió 4 mL de buffer Facs Flow para lavar las células mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Luego de comprobar la transparencia del sobrenadante, se le añadió a cada tubo 200 µL del buffer Facs Flow y se homogenizaron en el vórtex, se filtró con membrana de 0,2 µm para evitar tupición en los conductos del citómetro y se leyeron las muestras en el citómetro de Flujo marca Facs Scan® (Estados Unidos), utilizando los valores de adquisición específicos para leucocitos. El ensayo fue analizado en el programa WinMDi®. Se determinó el porciento de reconocimiento del producto por la ecuación 5.

$$R = \frac{\%\ \text{recon Ac evaluado}}{\%\ \text{recon Ac ref.}} \times 100 \qquad (5)$$

2.4.2. Determinación de la actividad biológica por Microscopía de Fluorescencia.

La determinación de la actividad biológica de los conjugados, anti IgG humana en carnero y anti IgG humana en pollo previa purificación se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta, para ello se fijaron los cortes de hígado de rata obtenidos en el criostato (firma SLEE London ECR- 01) (Alemania) en acetona de la fría a (- 20°C) por 20 min y a continuación se secaron las láminas a temperatura ambiente durante 10 min. Se identificaron las láminas con los siguientes datos: dilución de los conjugados a evaluar, conjugado de referencia (anti total humano-FITC producido en carnero por la Welcome), lámina control positivo (paciente) o lámina control negativo. Se realizó el lavado de las láminas con PBS por 5 min y se secaron las mismas alrededor del tejido sin dejar que este se seque. Luego se incubó con el suero del paciente a una dilución1/10 por 60 min. Se procedió a realizar otro lavado con PBS, y se decantó el exceso de líquido. Se incubó el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo a diferentes diluciones por 60 min a temperatura ambiente. Las diluciones de los conjugados empleadas fueron de 1/10, 1/20, 1/40, 1/60 y 1/80. Al finalizar este tiempo se realizaron lavados con PBS, y luego de secarlas se aplicó el medio de montaje PBS- glicerina y se realizaron las lecturas al microscopio de fluorescencia Zeizz G/017647(Alemania) Estándar 25 con el lente 40x. Los pacientes participantes de la investigación brindaron su consentimiento para la misma, dichos pacientes procedían del Servicio de Inmunología del Hospital General Docente “Dr. Ernesto Guevara de la Serna” de Las Tunas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Resultados y Discusión

3.1. Obtención de anticuerpos policlonales purificados

El desarrollo de métodos y técnicas para la purificación de proteínas ha sido un prerrequisito esencial para muchos de los avances de la biotecnología. La purificación de anticuerpos nos ha provisto de una poderosa herramienta para la obtención de diagnosticadores y muchos productos biotecnológicos de uso biofarmacéutico. De lo anterior se evidencia que es preciso seleccionar un método de purificación adecuado que permita realizar un balance entre resolución, capacidad, rapidez y recobrado. [46]

Los anticuerpos policlonales empleados para la investigación (IgG ratón, anti IgG humana en carnero y anti IgG humana en pollo) procedieron del grupo de Desarrollo de Tecnologías del LABEX. La pureza de estos anticuerpos fue garantizada por el proveedor, pues fueron obtenidos después de un proceso de purificación por inmunoafinidad.

3.1.1. Determinación de la pureza de los anticuerpos purificados

En los procesos de conjugación con anticuerpos resulta vital para la obtención de un producto marcador específico, el que no se detecte otra biomolécula en solución con el anticuerpo de interés, constituyendo un contaminante en la muestra. Entre los efectos que causa la presencia de dicho contaminante proteico se distingue el acoplamiento al fluorocromo marcador, creando luego un reactivo inespecífico para el diagnóstico. Por lo que resulta de gran importancia aplicar métodos que comprueben la presencia en la muestra biológica de un solo tipo de molécula[47].

La electroforesis de proteínas, cuyo fundamento es la separación de las moléculas según su carga eléctrica, nos permite aislar, separar y caracterizar moléculas según su peso molecular. [48] Se conoce que la IgG tiene un peso molecular aproximado de 150 kDa y la IgY de 165 kDa, y la presencia de una

única banda a este nivel puede ser determinado como un criterio de pureza, teniendo en cuenta el número de bandas que aparecen en el gel.[12]

La Figura 1 muestra el gel de electroforesis en condiciones no reducidas para el anticuerpo anti IgG humana en carnero. Los resultados demuestran que en el purificado obtenido, comparado con el patrón (Unstained de Biorad ®) de peso molecular, solo se exhibe una banda con un peso molecular aproximado de 150 kDa. El hecho de no observarse ninguna otra banda en la corrida de electroforesis, evidencia que en la muestra purificada no se detectan otras biomoléculas, resultado que nos permite fundamentar que el producto obtenido no contiene ningún contaminante detectable a las condiciones de ensayo.

La molécula de inmunoglobulina al separarse en sus cadenas ligera y pesada, favorecida por las condiciones reductoras, se obtienen sus pesos relativos que son de aproximadamente 25 kDa y 50 kDa respectivamente, según plantean los autores Kumagai y col. [13]

En la Figura 2, se muestra la electroforesis en condiciones reductoras con desnaturalización de la conformación nativa de la molécula purificada; donde se observan dos bandas correspondientes a la cadena pesada (50 kDa) y la cadena ligera (25 kDa); referidos al patrón utilizado, en correspondencia con el trabajo citado. [13]

3.1.2. Determinación de la concentración de los anticuerpos por espectrofotometría.

Las concentraciones de inmunoglobulinas en los purificados se determinaron por espectrofotometría UV-visible. Esta es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución, en este caso en presencia de una sola especie absorbente. [4,7]

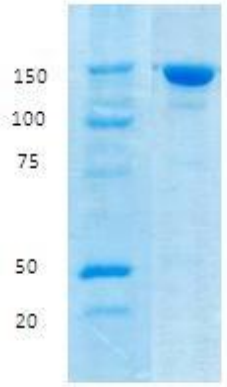


Figura 1. Electroforesis no reducida de la anti IgG humana en carnero. Izquierda Patrón de peso molecular, a la derecha banda obtenida a los 150 KDa perteneciente a la IgG purificada. Se aplicaron 10 µL del patrón de peso molecular (Unstained de Biorad®) y 15 µL de la muestra purificada, la cual estaba a una concentración de 4mg/ml, se diluyó 3 veces, para tener una masa de 20 µg por pocillo.

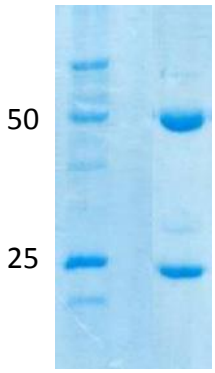


Figura 2. Electroforesis reducida de la anti IgG humana en carnero. Izquierda Patrón de peso molecular, a la derecha banda a los 25 kDa (cadena ligera) y 50 kDa (cadena pesada) perteneciente a la IgG purificada. Se aplicaron 10 µL del patrón de peso molecular (Unstained de Biorad®) y 15 µL de la muestra purificada, la cual estaba a una concentración de 4mg/ml, se diluyó 3 veces, para tener una masa de 20 µg por pocillo.

Los valores de la concentración obtenidos, se muestran en la Tabla 1, los mismos estuvieron comprendidos entre 4 – 8 mg/ml, superando los criterios de aceptación para estos anticuerpos en cada caso, que según los documentos técnicos aplicados en LABEX para dichos productos debe ser mayor de 2 mg/ml.

Teniendo en cuenta que los purificados constituyen productos intermedios que formarán la materia prima de los conjugados, es importante garantizar las condiciones óptimas para el proceso de conjugación, entre las cuales se destacan para todos los casos concentraciones de anticuerpos mayores de 2 mg/ml, según lo planteado por los autores Kantor y Roederer. [49]

3.2. Obtención de ficoeritrina. Determinación de su concentración y pureza.

El creciente interés por utilizar colorantes de origen biotecnológico que puedan sustituir colorantes sintéticos, demanda la búsqueda de productos candidatos y el desarrollo de procesos atractivos para su implementación a nivel comercial.

La B-ficoeritrina (BPE) es una ficobiliproteína de color rosa intenso, que representa un caso interesante en este contexto, debido a que ha demostrado tener aplicación como marcador molecular. [27] El valor comercial de la B-PE altamente pura (definida como una relación de absorbancias a 545 y 280 nm mayor a 4.0) ha sido reportado en $350 dólares/mg .[50]

Este elevado valor comercial justifica los intentos previos por desarrollar procesos eficientes para la recuperación y purificación de B-PE. [51,52]

La ficoeritrina empleada para la conjugación fue obtenida por el grupo de Desarrollo de Tecnologías del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Santiago de Cuba, para la obtención de este pigmento se utilizó la cepa de la microalga roja *Porphyridium cruentum*, esta biomasa fue

Tabla 1. Concentraciones de los anticuerpos purificados, se realizan tres lecturas para lograr repetibilidad.

Anticuerpos	Densidad óptica 280 nm	Dilución	Concentración mg/mL
IgG ratón	0,787	15	8,19
	0,729	15	7,59
	0,68	15	7,08
Anti IgG humana en carnero	0,588	10	4,08
	0,61	10	4,23
	0,692	10	4,80
Anti IgG humana en pollo	0,622	10	4,32
	0,7	10	4,86
	0,78	10	5,41

obtenida en el Centro Investigaciones de Energía Solar (CIE). El grado de pureza de la misma fue garantizado por el proveedor para los fines de conjugación.

La creciente importancia comercial de colorantes de origen microbiano para ser utilizados en la industria de alimentos, cosméticos, detergente y de genética molecular, ha despertado un enorme interés de las compañías biotecnológicas por el desarrollo de procesos eficientes y de fácil escalamiento para llevar al mercado estos productos.[51, 53]

El reducido número de protocolos reportados para la recuperación primaria de colorantes proteicos intracelulares involucran; la liberación del producto de interés mediante métodos mecánicos y posterior recolección por centrifugación. La suspensión resultante es fraccionada para purificar el colorante proteico mediante un excesivo número de operaciones unitarias.

El protocolo completo en la mayoría de los casos es complicado por las multi-etapas cromatográficas necesarias para obtener la proteína de interés con los niveles de pureza necesarios. La necesidad de multi-etapas que demandan los protocolos convencionales comúnmente resulta en bajos rendimientos y altos costos de procesos. [54]

Consecuentemente, el escalamiento potencial de este tipo de procedimientos es percibido negativamente desde el punto de vista económico. Para minimizar las desventajas atribuidas a los protocolos de purificación establecidos para colorantes proteicos, se ha propuesto la reducción de etapas cromatográficas[55] y el uso de técnicas de recuperación alternativas, tales como sistemas de dos fases acuosas (SDFA).[56]

SDFA ha sido sugerido como una alternativa atractiva para minimizar o eliminar algunas de las desventajas atribuidas a los protocolos de purificación de B-PE

establecidos. La técnica de SDFA ha demostrado tener un enorme potencial para la recuperación y purificación de compuestos biológicos.[57, 58] La recuperación y purificación parcial de B-PE producida por *Porphyridium cruentum* utilizando SDFA ha sido reportada anteriormente.[59]

La pureza y concentración de la proteína se corroboró empleando dos métodos: Espectrofotometría UV-Vis y Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Inicialmente se corroboró la pureza y la concentración midiendo la densidad óptica a 495 y 545 nm, obteniendo una relación DO545 nm/DO 495 nm ≥ 2, siendo este valor aceptable para la identificación del pigmento de ficoeritrina, pues al ser comparado con los documentos técnicos aplicados en LABEX para dicho producto, evidencian la pureza de la ficoeritrina[60]. Esto no se corresponde con lo planteado por los autores Benavides y Rito-Palomares, 2005 y Bermejo R et al. 2003, pues estudios realizados por los mismos plantean que una razón DO545 nm/DO 280 nm> 4 garantiza la pureza de la B-ficoeritrina.[52, 61]

En este trabajo no se aplicó la relación DO545 nm/DO 280 nm > 4 propuesta por Benavides y Rito-Palomares, 2005 y Bermejo R et al. 2003, ya que en estudios realizados en LABEX se observó que existía variabilidad en las lecturas a 280 nm, afectadas fundamentalmente por la concentración del buffer, el pH y diluciones de muestra, por lo que se ensayaron diferentes valores de absorbancia hasta lograr estabilidad.

En la figura 3 se muestra el espectro de absorción de la molécula fluorescente, el cual mostró máximos de absorción a 565 y 545 nm, con un hombro a 495 nm, se conoce que existen tres tipos de ficoeritrina en *Porphyridium cruentum*, siendo la B-PE la que presenta un hombro de absorción a 495 nm. El resultado obtenido corresponde con el espectro clásico para la caracterización de este

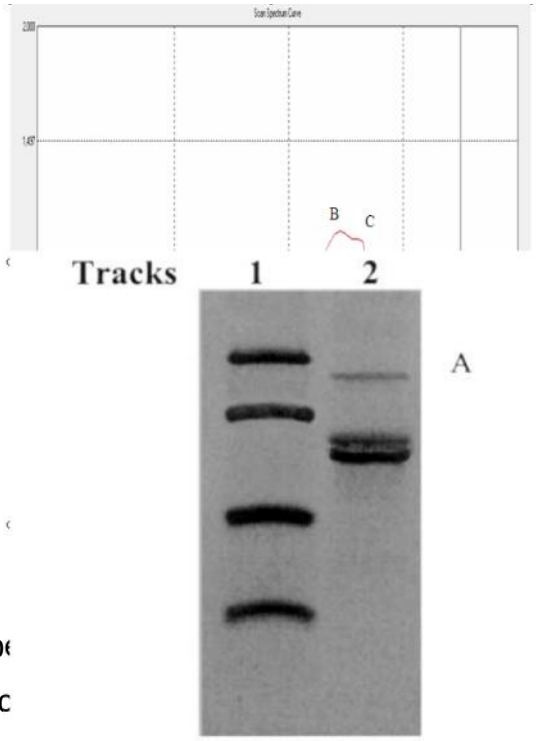


Figura 3. Espe icada, A: hombro a 495 nm, B y C: pic 5 nm.

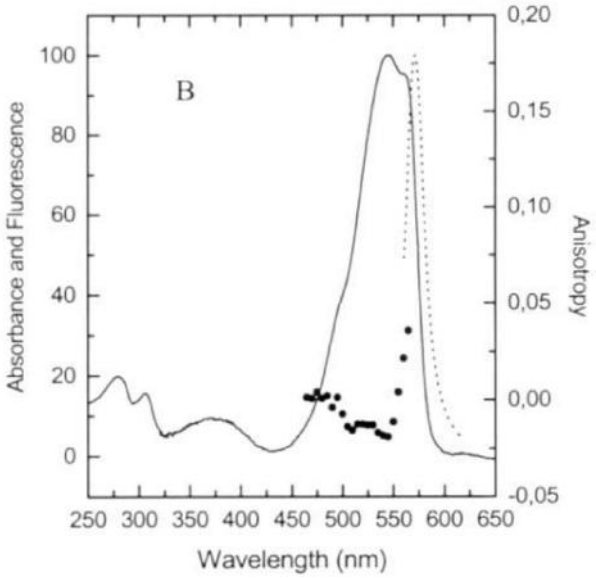


Figura 4. Espectro de absorción de la B-ficoeritrina purificada tomada de *R. Bermejo Roma´n et al. / Journal of Biotechnology* 93 (2002) 73

pigmento puro y concuerda con lo publicado para el espectro de absorción de las ficoeritrinas por Bermejo *et al*. 2003, ver figura 4. [25, 27]

La B-PE está formada por tres subunidades α, β, y γ (en una relación molar de 6:6:1) de peso molecular igual a 18,000, 18,000 y 29,000 g/mol, respectivamente.[52]

Los resultados de SDS-PAGE reducida se muestran en la figura 5, apreciándose una banda muy ancha aproximadamente a 17 kDa, la cual corresponde a las subunidades α y β encontradas en las principales ficobiliproteinas de cianobacterias y algas rojas[27], se observó también otra banda no tan ancha a los 28 kDa, correspondiente a la subunidad γ, arrojando similares resultados a los expuestos por Bermejo el al.2003 [27, 52], tales resultados se muestran en la figura 6.

En revisiones realizadas a catálogos de la Sigma, aparecen reportados como criterios de pureza para la B-PE, electroforesis SDS PAGE reducida con dos bandas, una alrededor de los 17 kDa y la otra aproximadamente a los 28 kDa, así como un máximo de absorción reportado a los 545 nm que en buffer fosfato 100 mM a pH 7 posee un coeficiente de extinción molar de 5,26.[62]

3.3. Obtención de los Anticuerpos policlonales conjugados con B-ficoeritrina (B-PE).

Para lograr un proceso de conjugación eficiente, primeramente se garantizó que la proteína cumpliera con los parámetros críticos según plantean los autores Roederer y Kantor para lograr la efectividad del acoplamiento entre las dos moléculas.

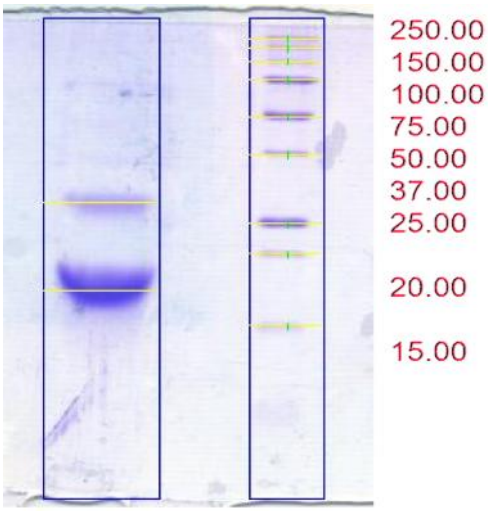


Figura 5. Electroforesis SDS PAGE en condiciones reductoras de PE. Izquierda: bandas obtenidas a los 17 y 28 kDa correspondientes a la B-ficoeritrina; Derecha: patrón de peso molecular.

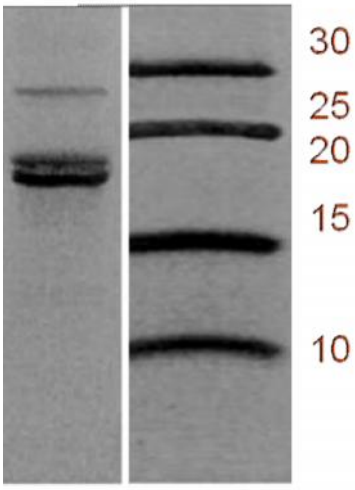


Figura 6. Electroforesis SDS PAGE en condiciones reductoras de la PE.Izquierda: bandas obtenidas a los 17 y 28 kDa correspondientes a la B-ficoeritrina. Derecha: patrón de peso molecular tomada de *R. Bermejo Roma´n et al. / Journal of Biotechnology* 93 (2002) 73.

- ✓ Concentración del anticuerpo mayor de 2mg/mL.
- ✓ Ausencia de Azida Sódica (NaN_3) en la solución del anticuerpo.
- ✓ pH neutro del anticuerpo, lo que facilita la interacción con el fluorocromo.
- ✓ La solución del fluorocromo en el disolvente (DMSO) debe ser preparada al momento de ser utilizada para evitar la oxigenación del mismo.

El trabajar con una concentración mayor de 2 mg/mL garantizó la efectividad de la conjugación al permitir mayor interacción entre el anticuerpo y el PE. Esta interacción es de tipo covalente[46].

La presencia de una sal como la azida sódica en solución con el anticuerpo, provoca que ocurra un fenómeno llamado salting in; donde en un medio poco salino la solubilidad de las proteínas aumenta al incrementar la concentración de sales[46]

Según se aumenta la fuerza iónica del medio los iones en que éstas se disocian rodean a las proteínas e interaccionan con sus grupos ionizables; evitando así, que se establezcan interacciones atractivas entre las cadenas laterales o extremos cargados de las proteínas. Dicho fenómeno puede impedir que ocurra la interacción de la proteína con el fluorocromo por sus grupos activos. [46]

Se conocen diferentes métodos para la conjugación con ficobiliproteínas, en los cuales se emplean reactivos heterobifuncionales (SPDP, SMCC y GMBS) que dan lugar a la formación de enlaces covalentes, permitiendo así la unión de las ficobiliproteínas a moléculas específicas.[37]

Por lo general la conjugación con PE es muy sencilla, suele hacerse en un día si de antemano se ha previsto la diálisis del pigmento, pues cuando la ficoeritrina ha sido almacenada con sulfato de amonio, debe someterse a un exhaustivo proceso de diálisis para posteriormente proceder con la conjugación, de ahí la importancia de que exista un proceso de preparación del

fluorocromo, ya que hace menos complejo la etapa de conjugación, además de abaratar los costos de la misma.

En nuestro trabajo el protocolo empleado para la obtención de los anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina (IgG ratón, anti IgG humana en carnero y anti IgG humana en pollo) fue el propuesto por Hardy detalladamente descrito en el capítulo anterior.

En la tabla 2 se muestran además las lecturas de absorbancia a 280 nm y 545 nm para los tres conjugados obtenidos, apreciando que las concentraciones de los mismos se comportaron entre 0.02 y 0.07 mg/mL, ya que se trabajó con pequeñas cantidades de anticuerpo y pigmento, por lo que si se desea obtener conjugados con mayor concentración se deben trabajar con mayores masas de ambos

3.4. Actividad biológica de los conjugados.

La determinación de la actividad biológica de los conjugados se realiza mediante una técnica que permita la visualización de la reacción de fluorescencia, presente luego de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo específico. Con este fin pueden ser empleadas las técnicas de: microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. [46]

Tabla 2. Comportamiento de las concentraciones de los conjugados.

Conjugados	**A 280 nm**	**A 545 nm**	**Dilución**	**Concentración conjugado mg/mL**
IgG ratón PE	0,152	0,549	2	0,07
	0,101	0,459	2	0,02
	0,099	0,455	2	0,02
Anti IgG humana en carnero PE	0,12	0,588	2	0,02
	0,129	0,610	2	0,02
	0,131	0,491	2	0,06
Anti IgG humana en pollo PE	0,152	0,622	2	0,05
	0,141	0,700	2	0,02
	0,123	0,455	2	0,06

3.4.1. Determinación de la actividad biológica por Citometría de Flujo.

La actividad biológica del producto conjugado IgG ratón ficoeritrina se determinó mediante la detección del porciento de reconocimiento por la técnica de Citometría de Flujo (C.F); donde se comparó el porciento de reconocimiento específico de un conjugado comercial DAKO® anti IgG ratón PE con el conjugado IgG de ratón PE obtenido en Labex. Como control negativo en el experimento se utilizó la línea celular A431, derivada de un carcinoma de células escamosas de vulva que expresa la molécula de superficie (Her1) la cual es reconocida por el anticuerpo murino R3. El canal específico utilizado para la detección del fluorocromo fue el FL2.[63] En la evaluación de la actividad biológica se tuvo en cuenta la intensidad de fluorescencia y la frecuencia de medición. (Anexo 7).

De los análisis realizados para el conjugado comercial en todas sus diluciones se obtuvo marcaje específico, lo que ratifica la reacción antígeno-anticuerpo donde reconoce con alto grado de especificidad al IgG de ratón-PE. Se observa además que a mayor dilución tuvo una mayor intensidad de fluorescencia, indicando que el anticuerpo estaba más concentrado que los antígenos que expresa la línea celular empleada.

La tabla 3 y la figura 7 muestran que al realizar la comparación del conjugado obtenido con el conjugado comercial no se aprecia ni intensidad de fluorescencia, ni frecuencia de medición, equivalente a la ausencia de marcaje específico, por lo que se recomienda el uso del conjugado IgG ratón-PE como control negativo contra anticuerpos primarios monoclonales conjugados con ficoeritrina, para eliminar el efecto que pudiera causar la fluorescencia de los marcadores empleados influyendo sobre el resultado final, siendo compensada con la fluorescencia del control negativo.[63, 64]

Tabla 3. Medición del Porciento de Reconocimiento Específico por Citometría de Flujo.

Conjugado	**Dilución(ul)**	**Porciento Reconocimiento específico**
Anti IgG ratón-PE DAKO®	10	95.88
		99.68
		100.00
IgG ratón-PE LABEX	10	0.12
		0.56
		0.48

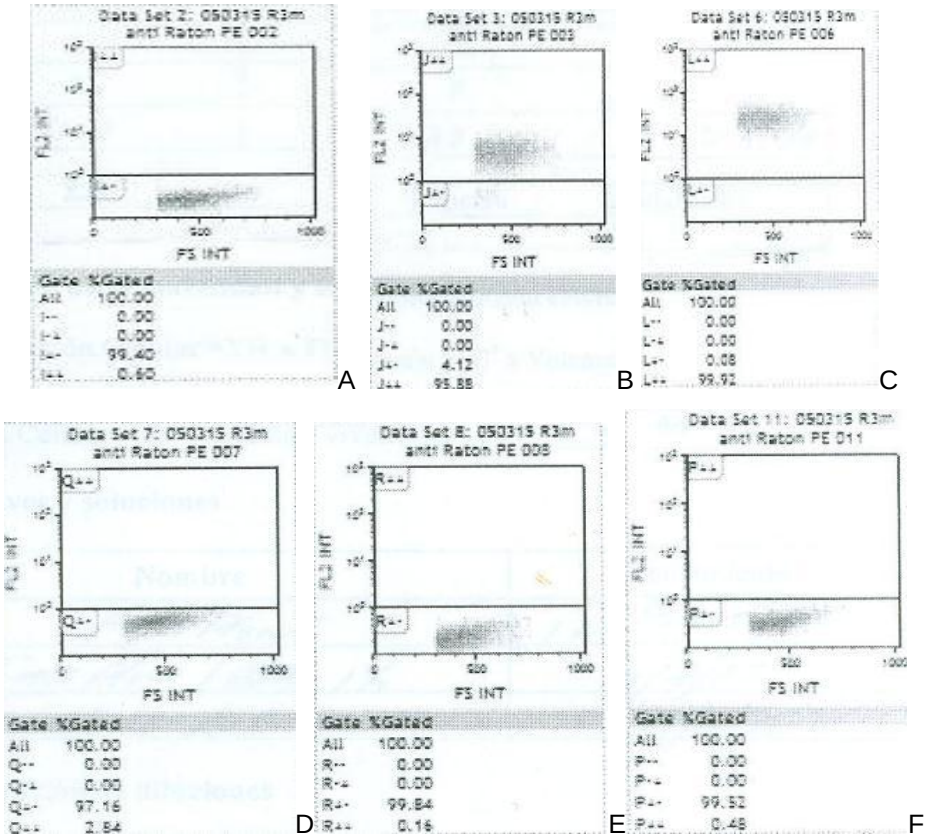


Figura 7. Histogramas obtenidos de la Citometría de Flujo para el conjugado IgG ratón-PE. (A y D controles negativos, B y C diluciones del anti IgG PE DAKO®/IgG PE LABEX, E y F diluciones del IgG ratón PE LABEX.

La firma DAKO® que comercializa estos reactivos, utiliza anticuerpos monoclonales como control positivo y negativo. En este trabajo el control negativo al ser policlonal brinda la posibilidad de emplearlo con controles positivos monoclonales cuya especificidad de reacción quede incluida en la del policlonal empleado como es el caso de la IgG de ratón que contiene 4 subclases (IgG 1, 2a, 2b, 3).

3.4.2. Determinación de la actividad biológica por Microscopía de Fluorescencia.

Las enfermedades autoinmunes sistémicas se caracterizan por la producción de autoanticuerpos, que son inmunoglobulinas que reaccionan contra estructuras celulares del propio organismo y que se encuentran en una cantidad suficiente para ser detectadas. La técnica de detección más utilizada es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que posee una gran sensibilidad, aunque menor especificidad. Los resultados son semicuantitativos y su valoración precisa de personal experto para su lectura. [65,66]

Para la detección de ANA por IFI se puede utilizar el conjugado anti-IgG o polivalente (anti-IgG, IgM e IgA) pero este último puede detectar anticuerpos sin significación clínica, especialmente por la presencia de anticuerpos IgM naturales. Debido a que el isotipo IgG es el que más se asocia con estas enfermedades existen grupos que sostienen la conveniencia de utilizar conjugado anti-IgG para la detección de ANA. [67]

En el caso del conjugado anti IgG humana-PE en carnero se evidenció el reconocimiento de los anticuerpos antinucleares en los controles positivos en comparación con el conjugado patrón. No hubo, por su parte, marcaje inespecífico en relación a los controles negativos. El rango de dilución óptima de los conjugados fue de 1/40 – 1/80 (Tabla 4), de las muestras analizadas, en la 2 se logró una mayor dilución óptima de trabajo, lo que nos ofrece la

Tabla 4. Resultados del reconocimiento específico de los anticuerpos en sueros controles positivos mediante Inmunofluorescencia indirecta. (Anticuerpo secundario anti IgG humana en carnero-PE)

Conjugados	**Diluciones**					**Patrón expresado**
	1/10	**1/20**	**1/40**	**1/60**	**1/80**	
Patrón de referencia	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Moteado, Homogéneo y Nucleolar
Muestra 1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Moteado
Muestra 2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Homogéneo
Muestra 3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Nucleolar

posibilidad de obtener una mayor cantidad de frascos de producto final, disminuyendo así los costos de producción.

Para el caso del conjugado anti IgG humano-PE en pollo se demostró el reconocimiento de los anticuerpos antinucleares en los controles positivos en comparación con el conjugado patrón. No hubo marcaje inespecífico en relación a los controles negativos. La dilución óptima de los conjugados fue de 1/40, lo que indica que en esta se logró optimizar la cantidad de anticuerpo necesaria para realizar un marcaje efectivo en tejido, esto se aprecia en la (Tabla 5).

La variabilidad de marcaje en las pruebas pudieran estar influenciadas por disímiles factores, como son: la concentración de antígeno, la concentración del conjugado y que se utilizó un patrón de referencia conjugado con FITC en vez de un patrón de referencia conjugado con PE.

Se conoce que existen 4 patrones de expresión cuando se utilizan conjugados con anticuerpos de mamíferos, pero en nuestro caso se utilizaron anticuerpos de pollo conjugados con ficoeritrina, lo cual pudiera definir nuevos patrones de expresión debido a que estos anticuerpos tienen una afinidad propia diferentes a los de mamíferos, a esto se suma que el conjugado de referencia empleado para los ensayos es de mamífero, por lo que pudiera darse el caso de que se expresen nuevos patrones desconocidos; por lo cual podemos asumir diferencias en la especificidad de los anticuerpos utilizados.

En las tablas 4 y 5 se aprecia que el marcaje del conjugado antihumano en carnero se observó en las tres muestras hasta la dilución 1:60, siendo 1:80 para el caso de la muestra 2, lo que pudiera estar determinado por la concentración de antígenos en la misma; para el caso del conjugado antihumano en pollo el marcaje en las tres muestras escogidas fue hasta la dilución 1:40, lo que pudiera deberse a que las muestras utilizadas fueron d

Tabla 5. Resultados del reconocimiento específico de los anticuerpos en sueros controles positivos mediante Inmunofluorescencia indirecta. (Anticuerpo secundario anti IgG humana en pollo-PE)

Conjugados	**Diluciones**					**Patrón expresado**
	1/10	**1/20**	**1/40**	**1/60**	**1/80**	
Patrón de referencia	Positivo	Positivo	positivo	Positivo	Positivo	Moteado, Homogéneo y Nucleolar
Muestra 1	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	Homogéneo
Muestra 2	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	Moteado
Muestra 3	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	Nucleolar

varios pacientes, estando afectadas por la concentración de antígenos en la muestra, la especificidad de isoforma por los antígenos y la concentración de los conjugados, la que en el caso del conjugado en pollo parece ser inferior a la del conjugado en carnero.

Como todas las pruebas de laboratorio, los ANA deben valorarse dentro de un adecuado contexto epidemiológico y clínico. Los ANA pueden ayudar en el proceso discriminador y diagnóstico, pero no pueden ser el elemento guía fundamental para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune sistémica. Una vez comprobada la positividad de los ANA, se tienen en cuenta si el paciente presenta ciertas manifestaciones clínicas sugestivas de enfermedad autoinmune, centrando el análisis en aquellas enfermedades más frecuentes según la edad y el sexo[8].

Los patrones de inmunofluorescencia son solo orientativos y no aportan la identificación definitiva de la especificidad de los anticuerpos existentes. Así, que ante resultados positivos de ANA, debemos detectar contra que especificidad antigénica nuclear van dirigidos estos autoanticuerpos responsables del patrón de fluorescencia observado. Para ello se utilizan técnicas de detección más sensibles y específicas basadas en la reacción antígeno anticuerpo tales como inmunoblotting, contrainmunoelectroforesis, radioinmunoanálisis (RIA) o el enzimoinmunoanálisis (ELISA), en las que se utilizan extractos de tejidos animales ricos en antígenos nucleares o citoplasmáticos[8,9].

3.5. Valoración económica aplicada a la obtención de los anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina.

La producción de diagnosticadores en Cuba es de considerable importancia por la repercusión social que tiene, al permitir un seguimiento clínico de

enfermedades de origen inmunológico, labor que engloba gran importancia desde el punto de vista cultural, social, económico y político.

En la actualidad la ciencia cubana ha destinado sus mejores esfuerzos en el desarrollo de los métodos diagnósticos y de seguimiento de este tipo de enfermedades. Por lo que disponer de anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina, producidos en nuestro país, con la calidad requerida para este tipo de estudio, hace más económico el diagnóstico y lo garantiza para todos los pacientes inmuno-comprometidos. [3, 33,46]

Para realizar una adecuada valoración económica de la obtención de los conjugados IgG ratón- PE, Anti IgG humana-PE en carnero, Anti IgG humana-PE en pollo, se deben tener en cuenta aspectos como: precio de los reactivos y su impacto en el país. Para ello se comparó para cada caso específico el precio del reactivo obtenido con el precio de un producto similar de la SIGMA y de este modo establecer las diferencias entre los mismos.

Como se observa en la Tabla 6, el precio de cada producto obtenido en LABEX resultó significativamente más bajo que el de los comercializados por la SIGMA en el año 2015 reportados en la Web. Debido a los altos precios que exhiben estos reactivos en el mercado internacional se hace muy difícil la adquisición de los mismos, por lo que si se emplearan los diagnosticadores de producción nacional, para el país esto se traduciría en una importante fuente de ahorro de divisas, a la vez que sustituiría la importación de los referidos productos, ofreciendo también la posibilidad de insertarnos como proveedores de estos reactivos al resto del mundo.

Tabla 6 Comparación de los costos de los conjugados policlonales-PE obtenidos en Labex con los adquiridos de la SIGMA.

Productos	**Precios de los productos**	
	Obtenidos en LABEX-CIM	Importados de la SIGMA (2015)
IgG ratón-PE (0.1 mg)	5 MU	145 USD
Anti IgG humana en carnero- PE(0.1 mg)	10 MU	38,5 USD
Anti IgG humana en pollo- PE(0.1 mg)	7 MU	1.98 USD
Ficoeritrina obtenida en Labex (1.0 mg)	6,516 MU	356 USD
Anti IgG humana purificada (50 mg)	208.159 MU	1104,16 USD

CONCLUSIONES

4. Conclusiones

1. Se obtuvieron los conjugados IgG de ratón, anti IgG humana en carnero y anti IgG humano en pollo con ficoeritrina, mediante el protocolo de Hardy, cumpliendo con el parámetro técnico para estos productos.

2. El conjugado IgG de ratón-ficoeritrina no mostró por ciento de reconocimiento específico, revelando su potencialidad como control negativo para Citometría de Flujo.

3. La actividad biológica de los conjugados Anti IgG humana- ficoeritrina en carnero y Anti IgG humana-ficoeritrina en pollo evidenció el reconocimiento específico de los anticuerpos antinucleares en sueros controles positivos a diluciones comparables a las del reactivo comercial.

4. Se logró desarrollar un proceso para la obtención de anticuerpos policlonales conjugados con ficoeritrina con aplicaciones potenciales al inmunodiagnóstico.

RECOMENDACIONES

5. Recomendaciones

- Lograr la introducción de estos diagnosticadores en el proceso productivo.
- Realizar experimentos de conjugación con ficoeritrina para obtener datos que permitan la validación de estos conjugados en cuanto a la relación molar conjugado fluorocromo.
- Continuar los estudios con anticuerpos de pollo conjugados con ficoeritrina con el objetivo de discernir nuevos patrones de ANA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referencias Bibliográficas

1. Denizli A. Purification of Antibodies by Affinity Chromatography. Biol. & Chem., 2011; 39 (1): 1–18.

2. Burns DE. Preparation of polyclonal antibodies. En: 13. Deustcher MP, editor. Methods in enzymology.Londres.Academic Press Inc 1990. p. 663-7.

3. Toledano M, Molina R, Rodríguez T, Aviñó J, Serrano O. Evaluación del desempeño de los conjugados anti-CD4/FITC y anti-CD8/FITC producidos en LABEX. MEDISAN 2006; 10(4).

4. Jorge D, Lara C, Hidalgo C. Interpretación básica de inmunohistoquímica: características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. Patología Revista Latinoamericana 2011; 45 (3) julio- septiembre.

5. Ausubel FM, Brent R., Kingston R E, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology New York: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience (1994)

6. Arcavi M, Orfus G. Prevalencia de anticuerpos anti envoltura nuclear y sus isotipos en sueros positivos para anticuerpos antinucleares. MEDICINA (Buenos Aires) 2006; 66: 327-331.

7. Benítez CL, Rincón OL, Quintero JL, Aristazábal BH. Concordancia entre la determinación de anticuerpos antinucleares por Inmunofluorescencia e inmunoensayo lineal. Medicina y Laboratorio 2011; 17(9- 10).

8. Munive MR, Domínguez JS, González R, Suárez ME. Comparación entre quimioluminiscencia e inmunofluorescencia indirecta en la determinación de anticuerpos antinucleares. Rev Mex Patol Clin 2012, Abril – Junio; 57(2): 100-4.

9. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative antinuclear antibody immunofluorescence screening test. Clin Chem 2002; 48 (12): 2171-2176.

10. Kokuina E. De la autoinmunidad a las enfermedades autoinmunes. Rev Cubana Med 2001, Ene –Mar; 40 (1)

11. Carpinelli M. Frecuencia de los patrones de anticuerpos anti-nucleares en pacientes con sospecha clínica de LES. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud 2010, Diciembre 8(2): 27-33.

12. Kumagai I, Tsumoto K. Antigen-Antibody Binding, Encyclopedia of life sciences.2011 Macmillan Publishers. Nature Publishing Group/www.els.net

13. Abbas AK., Lichtman, AH and Pober JS. Inmunología Celular y Molecular. 3 ed. McGraw-Hill-Interamericana. 2010

14. Abbas & Lichtman. Basic Inmunology. Antigen Recognition in the Adaptative Immune System: Structure of Lymphocyte Antigen receptor and the development of Inmune Repertoires. 2001; Chapter 4: 307

15. Antibody Purfification, 2004, Hand book, Amersham Pharmacia Biotech, Edition AC, 18-1037-46.

16. Rodríguez, S. conferencia de Bioquímica Avanzada. Maestría en Biotecnología, 2012.

17. http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cromatografia.htm consultada: 26/10/2013

18. Poole CF. The Essence of Chromatography. 3 ed. (2013) ELSEVIER.

19. http://cromatografia-por-exclusion-molecular.html Fecha de consulta: 27/3/2012

20. Gel Filtration Principles and Methods. 2004. Handbooks from Amersham Biosciences. Edition 18-1022-18

21. Ion Exchanger Chromatography, (2002) Principles and Methods, Amersham Biosciences, Edition AB, 18-1114-21. ISBN 91 970490-3-4

22. Peng X,Chen H, Draney DR, Volcheck WM. A Non-fluorescent, Broad Range Quencher Dye for FRET Assays, Analytical Biochemistry, 2009; (Vol. 388).

23. Robinson JP et al. Handbook of Flow Cytometry Methods. 2006.

24. Carey, McCoy, and Keren, Flow Cytometry in Clinical Diagnosis, 2007;4 ASCP Press,ISBN 0-89189-548-5.

25. Fernández J. Tesis de Maestría. Obtención de la β -ficoeritrina a partir de Porphyridium cruentum y su uso en el inmunodiagnóstico, 2007. Santiago de Cuba. Cuba.

26. Glazer NA. Phycobiliproteins-a family of valuable, widely used fluorophores. Juornal of Applied Phycology 1993; (6): 105-106.

27. Bermejo R, Talavera EM, Álvarez-Pez JM. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative HPLC separation and characterization of its subunits. J. Chromatogr. 2003; (917): 135–145.

28. Michael T, John M, Parker J. Brock. Biología de los microorganismos. 2008. 10 ed. Editorial Pearson Educación.

29. Básaca-Loya GA, Valdez MA, Enriquez-Guevara EA, Gutierrez-Millán LE, Burgoa MG. Extracción y purificación de B-ficoeritrina de la microalga *Rhodosorus marinus.* Revista Ciencias Marinas 2010; 35(4): 359-368

30. Galland-Irmouli AV, Pons L., Lucon M, Villaume C, Mrabet NT, Gueant JL., Fleurence J. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. J. Chromatogr. (2000); 739 (1): 117–123.

31. César Pérez-Maldonado, PhD. Conferencia de Introducción al Inmunodiagnóstico. (2009) Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia

32. Roitt IM, Delves PJ. Inmunología, fundamentos. 2003 Editorial Médica Panamericana, Argentina.

33. Gutierrez EJ, Samón T, Miranda A, Fernández G, Higginson D, Sierra G, et al. Obtención de un conjugado anti IgG de ratón – FITC mediante la tecnología IgY para uso como anticuerpo secundario en la detección de antígenos de superficie celular. Revista CENIC Ciencias Biológicas 2007; 38 (1): 85-89.

34 Castro CH, Gurley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J Allergy Clin Immunol. 2011; 125 (2): 238-247.

35. Oi V, Glazer A, Stryer L, “Fluorescent phycobiliproteins conjugates for analyses of cells and molecules”. 1982. J.Cell Biol. 93: 981-986.

36. Hernández T, Benavides J, Rito M, Proceso para la purificación del colorante proteico B-ficoeritrina producido por Porphyridium cruentum. Revista Mexicana de Ingeniería Química, ISSN (Versión impresa): 2006. 1665-2738, 5(002):131-143

37. Kokuina E, Argüelles A, Casas N, Pérez D, Infante A, Velbes P, Pérez R. Autoanticuerpos diagnósticos en enfermedades autoinmunes sistémicas y específicas de órgano Rev Cubana Med. 2006 Abr.-Jun, 45(2).

38. Carpinelli M. Frecuencia de los patrones de anticuerpos anti-nucleares en pacientes con sospecha clínica de LES. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud 2011, Diciembre 8(2): 27-33 27.

39. Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE, Sawyer BG. Test Fundamentals of Clinical Chemistry.2008; Saunders (Elsevier) 6 ed. ISBN 978-0-7216-3865-2.

40. Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta-HEp-2. Acta bioquím. clín. Latinoam 2012; 46 (1). Primer Consenso Argentino para la. ISSN 0325-2957.

41. A Guide to fluorescent probes and Labeling Technologies, 10 Ed. Washington, SM Press, 2005: 100-275.

42. Fuentes D, González RR, Arroyo R. Influencia de la edad y el sexo de ratones balb/c sobre la producción de líquido ascítico rico en anticuerpos monoclonales. Rev. Salud Anim. 2001; 23 (1): 62-64.

43. Procedimiento Normalizado de Operación. Análisis e identificación mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de Ac M. G10-PNO-0015. (2007)

44. Documento de Calidad. Procedimiento para Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS:SDS-PAGE No Reducido. Ins-2011. Versión: 00.

45. Hardy RR. Purification and coupling of fluorescent proteins for use in flow cytometry. En: Handbook of experimental immunology. 4th ed. Oxford: Black-well Scientific; 1986.

46. Rabell G. Tesis de Maestría. Obtención del anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FICT). 2014. Santiago de Cuba. Cuba

47. Laemmli UK. Clavage of estructural proteins during de assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685. 1970

48. Catálogo: Products for Life Science Research. PE conjugation of Antibodies by Aaron Cantor Washington.Ed. SIGMA.FD, 2004-2005:1239-1242.

49. Galaktionov VG. Evolutionary development of the immunoglobulins super family. Izv Akad Nauk Ser Biol (2004); (2): 133-45.

50. Market Corporation, 2005, web page: http://www.marketbio.com. (consultada en Octubre 2013).

51. Bermejo R, Alvarez-Pez JM, Acien-Fernandez FG y Molina-Grima E.. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum. Journal of Biotechnology* 2002.*93,* 73-85.

52. Bermejo R, Acién FG, Ibáñez MJ, Fernández JM. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. J.Chromatogr. 2003.B 790: 317–325.

53. Qiu J, Madoz-Gurpide J, Misek DE, Kuick R, Brenner DE, Michailids G, Haab BB, Omenn GS, y Hanash S. Development of natural protein microarrays for diagnosing cancer based on an antibody response to tumor antigens. *Journal of Proteome Research.* 2004.*3,* 261-267.

54. Ranjitha K y Kaushik BD.Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. *Journal of Scientific and Industrial Research.* 2005. *64, 3*72-375.

55. Liu LN, Chen XL, Zhang XY y Zhou BC. One-step chromatography method for efficient separation and purification of Rphycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal o Biotechnology. 2005. 116,* 91-100.

56. Benavides J y Rito-Palomares M. Potential aqueous two-phase processes for the primary recovery of colored proteins from microbial origin. *Engineering in Life Science* 2005. *5,* 259-266.

57. Rito-Palomares M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. Journal of Chromatography 2004 B 807, 3-11.

58. Rito-Palomares M y Lyddiatt A. Practical implementation of aqueous two-phase processes for protein recovery from yeast. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2000. 75, 632-638.

59. Benavides J y Rito-Palomares M. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from Porphyridium cruentum. Journal of Chromatography. 2004 B 807, 33-38.

60. Documento de Calidad. Procedimiento para Purificación de B-ficoeritrina a partir de microalga roja *Porphyridium cruentum*. Ins-2014. Versión: 00

61. Ferrer J. Trabajo de Diploma. Aceleración del crecimiento de Porphyridium cruentum con campos magnéticos. 2012. ISPJAM. Santiago de Cuba. Cuba.

62. Protocolo de la SIGMA. Disponible en: www.sigma-aldrich.com

63. Overview of Flow Cytometry. Current Protocols in Immunology. Supl. 20. 1996

64. Janeway ChA. Inmunobiology. The inmune system in health and diease. Chap2, pgs 2:28-2:29. 2ed. 1996.http://www.isac-net.org/

65. Jagschies G., Gronberg A., Bjorkman T., Lacki K., Johansson H. Technical an Economical Evaluation of Downstream Processing Options for Monoclonal Antibody (Mab) Production. BioPharm International. 2006. Disponible en: www.biopharminternational.com.

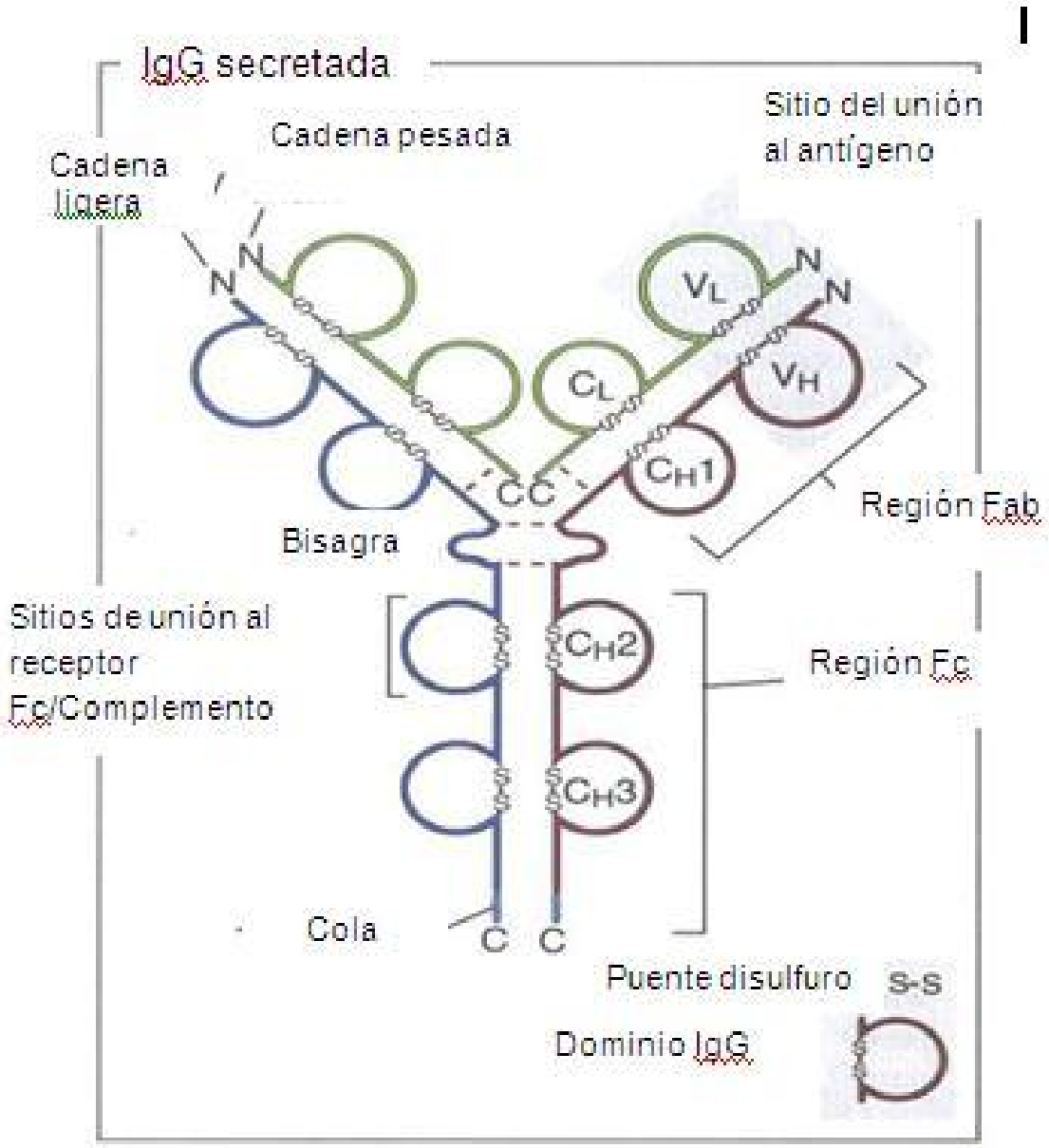
66. Vicent C, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. Autoinmunity 2005; 38: 17-24

67. Rivera S. Tesis de Maestría. Obtención de un conjugado Anti - IgG humana con Isotiocianato de Fluoresceína y su evaluación en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes. 2014, Santiago de Cuba. Cuba

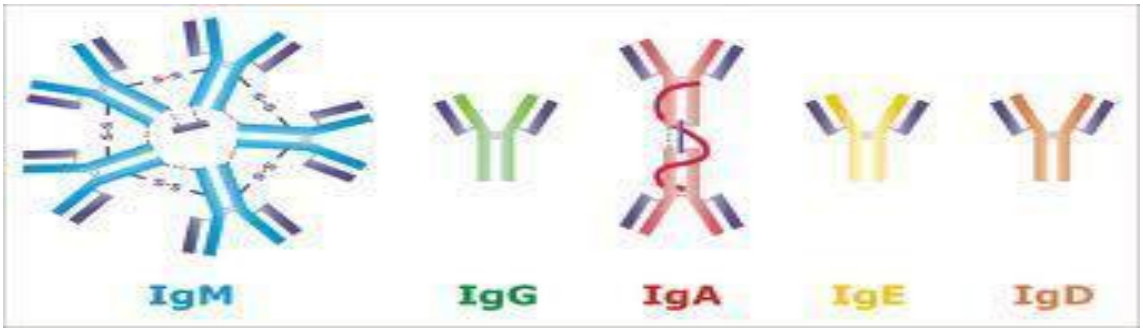
ANEXOS

7. Anexos

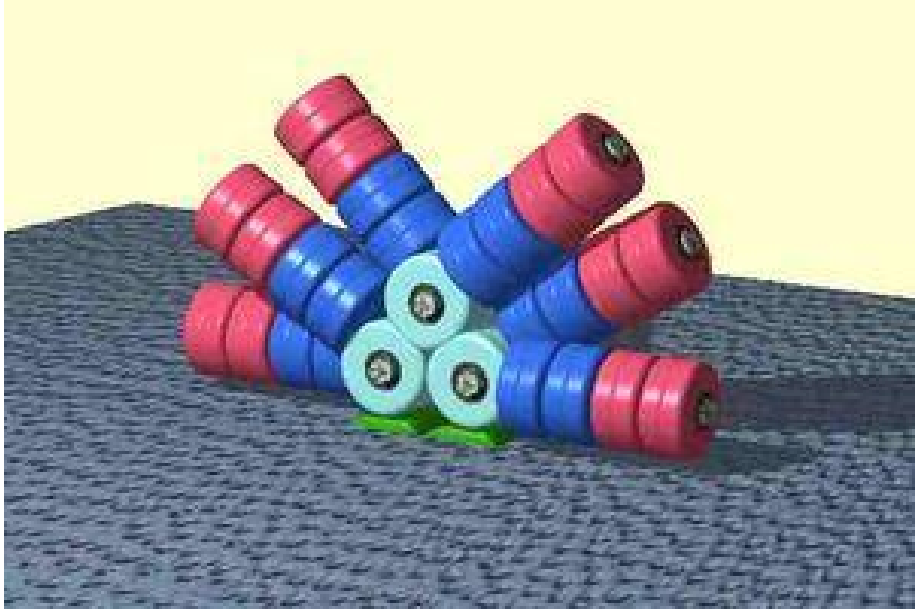
Anexo 1. Diagrama esquemático de la estructura del anticuerpo (IgG secretada). Tomada de Inmunología Básica. Abbas y Lichtman.



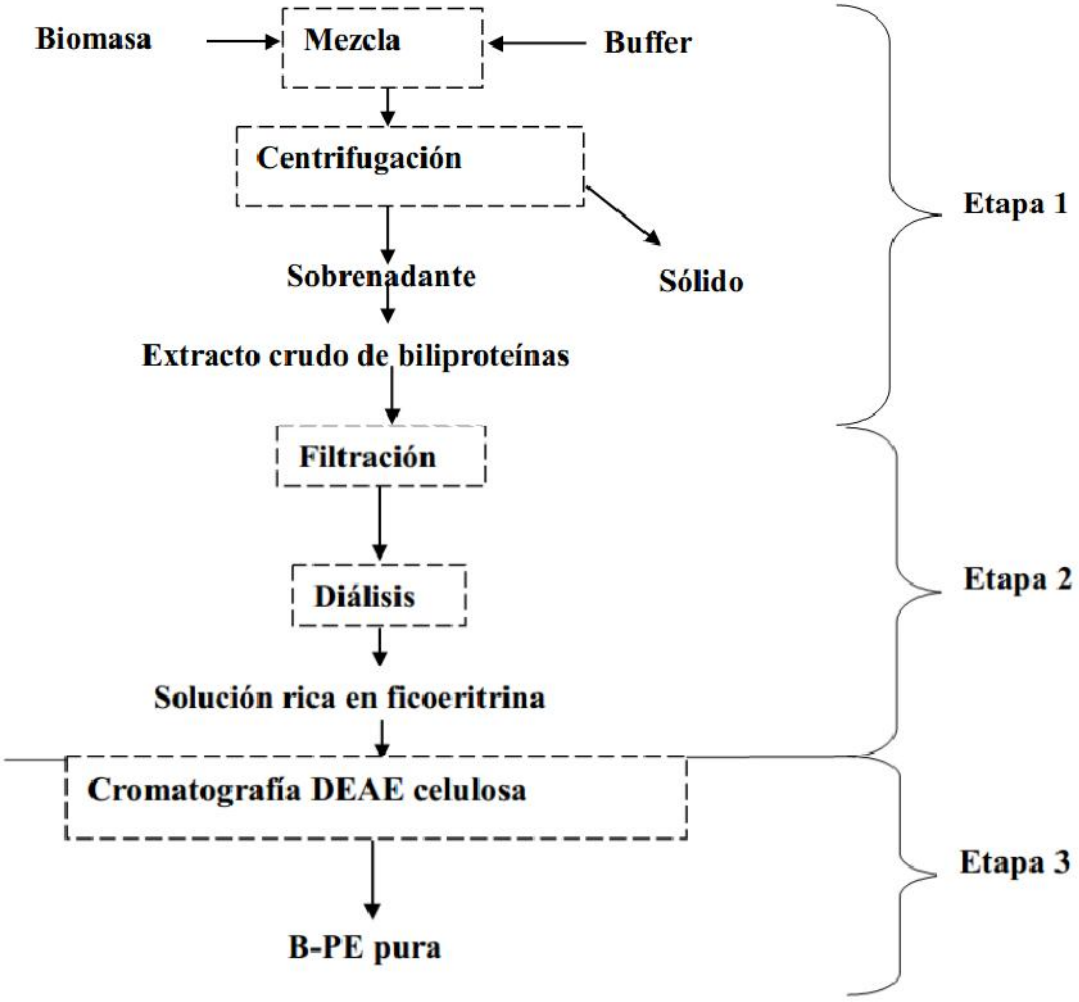
Anexo 2. Diagrama representativo de las cinco clases de inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD). Tomada de Inmunología Básica. Abbas y Lichtman.



Anexo 3. Ficobilisoma. Estructura que facilita la recolección de energía lumínica en cianobacterias y algunos tipos de algas. (Rojo: ficoeritrina, Azul: ficocianina, Celeste: aloficocianina, Verde: centro de reacción).



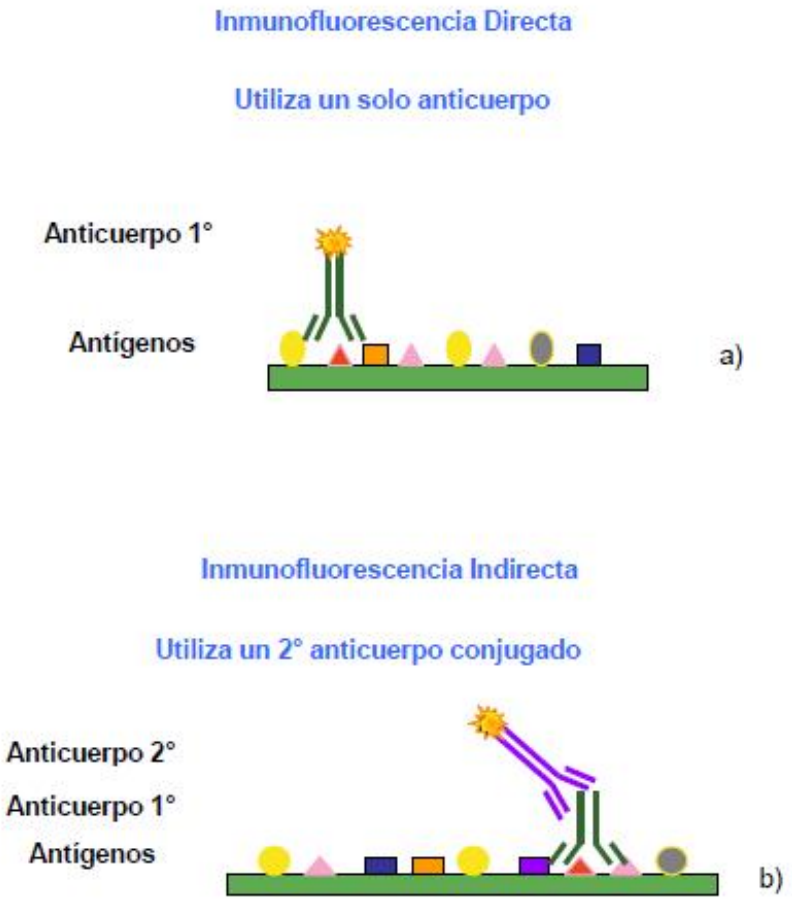
Anexo 4. Diagrama de bloque del proceso de obtención de β-PE.



Anexo 5. Técnicas de Inmunomarcaje

Trazador	Denominación
Complejo Ag-Ac	Técnicas de inmunoprecipitación (técnica de Ouchterlony, Inmunoelectroforesis, difusión radial Mancini, nefelometría, etc.)
Aglutinado	Técnicas de inmunoaglutinación. (Hemaglutinación directa e indirecta y otras técnicas con látex, etc.)
Fluorocromo	Técnicas inmunofluorimétricas
Radioisótopos	Técnicas inmunorradiológicas (Radioinmunoensayo -RIA-)
Enzimas	Técnicas inmunoenzimáticas

Anexo 6 Esquema de la Inmunofluorescencia: a) directa, b) indirecta.



Anexo 7. Medición del Porciento de Reconocimiento Específico por Citometría de Flujo para el conjugado IgG ratón-PE **(línea 1.** A431: línea celular derivada de un carcinoma de células escamosas de vulva que expresa la molécula de superficie (Her1), **línea 2**. Conjugado anti IgG de ratón-PE de referencia, lote 00054647, **línea 3**. R3m: anticuerpo murino que reconoce a Her1, lote D0301, **línea 7**. Conjugado obtenido en LABEX, IN 13-22

Original firma

CIM Centro de Inmunología Molecular

G10 REG-0020
VERSIÓN/ 01
PÁGINAS/ 2/3
ANTERIOR/ G10 REG-0020 (00)

MEDICIÓN DEL PORCIENTO DE RECONOCIMIENTO ESPECIFICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

6. Protocolo del ensayo

No	Producto	No. lote	Dilución/ concentración	% Rec. esp	Cumple	No cumple
1	A431	NP	NP	0,04	X	NP
2	Ant/PE	00054647	10ul	0,60	X	NP
3	R3m	D0301	10	95,88	NP	X
4				99,68	X	NP
5				100,00	X	NP
6				99,92	X	NP
7	IgG RATÓN/PE	IN 13-22 ~~D0301~~ 5/9/13	10ul	2,84	X	NP
8	R3m	D0301	10	0,16	X	NP
9				0,12	X	NP
10				0,56	X	NP
11				0,48	X	NP
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						NP
22						